



TITLE:

脳動脈瘤の発生・増大・破裂に関する分子機構の解析

AUTHOR(S):

橋本, 信夫

CITATION:

橋本, 信夫. 脳動脈瘤の発生・増大・破裂に関する分子機構の解析.
2004

ISSUE DATE:

2004-05

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/84677>

RIGHT:

学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。

脳動脈瘤の発生・増大・破裂に関する 分子機構の解明

課題番号 13307043

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金（基盤研究(A)(2)）研究成果報告書

平成16年5月

研究代表者 橋本信夫
(京都大学・医学研究科・教授)

京 都 大 学 図 書



1040940376

附 属 図 書 館

脳動脈瘤の発生・増大・破裂に関する
分子機構の解明

課題番号 13307043

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金（基盤研究(A)(2)）研究成果報告書

平成16年5月

研究代表者 橋本信夫
(京都大学・医学研究科・教授)

は し が き

研究組織

研究代表者：橋本信夫（京都大学・医学研究科・教授）

研究分担者：野崎和彦（京都大学・医学研究科・助教授）

研究分担者：北 徹（京都大学・医学研究科・教授）

研究分担者：久米典昭（京都大学・医学研究科・講師）

研究分担者：永田和宏（京都大学・再生医科学研究所・教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	17,200	5,160	22,360
平成14年度	14,700	4,410	19,110
平成15年度	8,900	2,670	11,570
総計	30,800	12,240	43,040

研究発表

(1) 学会誌等

Yamada S, Utsunomiya M, Inoue K, Nozaki K, Miyamoto S, Hashimoto N, Takenaka K, Yoshinaga T, Koizumi A

Absence of linkage of familial intracranial aneurysms to 7q.11 in highly aggregated Japanese families.

Stroke 34: 892-900, 2003

Kawanabe Y, Nozaki K, Hashimoto N, Masaki T.

Characterization of Ca²⁺ channels and G proteins involved in arachidonic acid release by endothelin-1/endothelinA receptor.

Mol Pharmacol 64: 689-695, 2003

Sadamasa N, Nozaki K, Moriwaki T, Hashimoto N

Disruption of gene for inducible nitric oxide synthase reduces progression of cerebral aneurysms.

Stroke 34: 2980-2984, 2003

Kawanabe Y, Okamoto Y, Nozaki K, Hashimoto N, Miwa S, Masaki T

Molecular mechanism for endothelin-1-induced stress-fiber formation: analysis of G proteins using a mutant Endothelin A receptor.

Molecular Pharmacol 61: 277-284, 2002

Takagi Y, Ishikawa M, Nozaki K, Yoshimura S, Hashimoto N

Increased expression of phosphorylated JNK and phosphorylated c-JUN in human cerebral aneurysms. The role of JNK/c-JUN pathway in apoptosis of vascular wall.

Neurosurgery 51: 997-1002, 2002

Morimoto M, Kume N, Miyamoto S, Mizoguchi A, Nozaki K, Sadamasa N, Kita T, Hashimoto N.

The roles of MMPs for cerebral aneurysm formation.

Kikuchi H. (Ed.) Strategic Medical Science Against Brain Attack (Springer-Verlag, Tokyo) pp.223-233, 2002

Morimoto M, Miyamoto S, Mizoguchi A, Kume N, Kita T, Hashimoto N.

Mouse model of cerebral aneurysm: experimental induction by renal hypertension and local hemodynamic changes.

Stroke 33:1911-1915, 2002

定政信猛、野崎和彦、橋本信夫

くも膜下出血モデル

分子脳血管病 3 : 83-87, 2004

定政信猛、野崎和彦、橋本信夫

脳動脈瘤の分子生物学

脳と循環 7 : 65-69, 2002

定政信猛、野崎和彦、橋本信夫

脳動脈瘤と遺伝子 ーポストゲノム時代を迎えてー

分子脳血管病 1 : 39-44, 2002

(2) 口頭発表

Nobutake Sadamasa, Kazuhiko Nozaki, Takuya Moriwaki, Nobuo Hashimoto

The Role of Inducible Nitric Oxide Synthase on Cerebral Aneurysms

The 3rd International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic

Applications of Nitric Oxide Nara, Japan 2004年5月24日

Nobutake Sadamasa, Kazuhiko Nozaki, Takuya Moriwaki, Nobuo Hashimoto

Inducible nitric oxide synthase in the development of experimental cerebral aneurysms

29th International Stroke Conference San Diego, California 2004年2月6日

Nobutake Sadamasa, Kazuhiko Nozaki, Nobuo Hashimoto, Kikuya Kato

The Mechanisms of Cerebral Aneurysm Formation -from morphology to expression profiling

The First ESF-JSPS Frontier Science Meeting for Young Researchers: Functional Genomics - from the bench to bioinformatics San Feliu de Guixols, Spain

2003年10月25日—31日

Nobutake Sadamasa, Kazuhiko Nozaki, Yasushi Takagi, Takuya Moriwaki, Masatsune Ishikawa, Nobuo Hashimoto

Role of Endothelin B Receptor in the Pathogenesis of Cerebral Aneurysms

第29回日本脳卒中学会 名古屋 2004年3月18日

森脇拓也、野崎和彦、定政信猛、橋本信夫

実験的脳動脈瘤における細胞外マトリックスの生理的阻害について

第29回日本脳卒中学会 名古屋 2004年3月18日

定政信猛、野崎和彦、橋本信夫

誘導型一酸化窒素合成酵素と脳動脈瘤 -iNOS ノックアウトマウスを用いた検

討

第 62 回日本脳神経外科学会総会 仙台 2003 年 10 月 1 日
定政信猛、野崎和彦、高木康志、森脇拓也、石川正恒、橋本信夫

脳動脈瘤におけるエンドセリン B 受容体の発現とその役割

第 62 回日本脳神経外科学会総会 仙台 2003 年 10 月 1 日
山田茂樹、野崎和彦、橋本信夫、小泉昭夫、宇都宮真木、井上佳代子

エラスチン遺伝子多型と脳動脈瘤多発家系

第 62 回日本脳神経外科学会総会 仙台 2003 年 10 月 1 日
山田茂樹、野崎和彦、橋本信夫、小泉昭夫、宇都宮真木、井上佳代子

脳動脈瘤の遺伝子解析

第 62 回日本脳神経外科学会総会 仙台 2003 年 10 月 1 日
野崎和彦

脳動脈瘤の遺伝子解析

第 13 回脳血管シンポジウム 大阪 2003 年 9 月 6 日
山田茂樹、野崎和彦、橋本信夫、小泉昭夫、宇都宮真木、井上佳代子

脳動脈瘤多発家系を用いた Genome-wide linkage analysis

第 4 回日本分子脳神経外科学会 2003 年 9 月 3 日
定政信猛、野崎和彦、橋本信夫

The effect of inducible nitric oxide gene-knockout on experimental cerebral
aneurysms in mice

第 3 回日本 NO 学会学術集会 熊本 2003 年 5 月 30 日
定政信猛、野崎和彦、橋本信夫

The effect of iNOS gene-knockout on the experimental cerebral aneurysms in mice

第 28 回日本脳卒中学会 東京 2003 年 3 月 14 日
山田茂樹、野崎和彦、橋本信夫、小泉昭夫、宇都宮真木、井上佳代子

脳動脈瘤多発家系の遺伝疫学

第 61 回日本脳神経外科学会総会 仙台 2002 年 9 月 4 日
山田茂樹、野崎和彦、橋本信夫、小泉昭夫、宇都宮真木、井上佳代子

家族性脳動脈瘤の遺伝要因

第 27 回日本脳卒中学会 2002 年 3 月 27 日

研究の概要と成果

研究目的

クモ膜下出血は、社会の柱となる壮年～中年期に脳動脈瘤の突然の破裂により引き起こされる予後不良の疾患であり、全身管理技術や顕微鏡手術が進歩した現在においても、約半数が死亡または廃疾となるため、予防を含めた新たな治療法の開発が必要である。しかし、原因となる脳動脈瘤については疫学的研究が散見されるが、その発生に関する研究は動脈硬化性病変と比べてほとんど進んでいないのが現状である。本研究では、脳動脈瘤の発生、増大、破裂に関する機序を遺伝子、分子レベルで明らかにすることを目的とし、脳動脈瘤発生、増大、破裂を効果的に予防する新たな治療法の開発を目指すものである。すなわち、ラット、サル、マウスの自然誘発脳動脈瘤モデルを用いて、脳動脈瘤形成過程における発現遺伝子、蛋白を解析し、脳動脈瘤の発生、増大、破裂に関わる因子の同定を行うとともにヒト脳動脈瘤関連遺伝子の検索を行い、同定された因子を操作することによる脳動脈瘤発生・増大の予防に基づいた治療法の開発を行う。

意義

ヒト脳動脈瘤標本の検討では、すでに完成された脳動脈瘤の病態の解析に留まり、その形成機序を解明することは困難である。我々はこの欠点を補うべく、世界に先駆けてラット、サルを用いて独自の自然誘発モデルを作成することに成功し、以降このモデルを用いた組織学的解析を進めてきた(Surg Neurol 10:3-8, 1978; Surg Neurol 11:243-246, 1979; Am J Pathol 110:397-399, 1983; Stroke 14:857-66, 1983; J Neurosurg 67:903-905, 1987; Stroke 19:507-511, 1988; Stroke 21:765-770, 1990; Stroke 21:1722-1726, 1990; J Neurosurg 73:242-247, 1990; J Neurosurg 74:258-262, 1991; Acta Neurochir (Wien)122:244-249, 1993; Stroke 28:398-403, 1997)。このモデルは片岡らが発表したヒト破裂脳動脈瘤の標本と病理学的特徴が酷似している(Stroke 30: 1396-1401, 1999)。このモデルを用いることで各形成段階における脳動脈瘤を解析することができる。我々は脳動脈瘤形成機序解明に関連した報告をこれまでに40本近く発表してきており、多くが権威ある英文雑誌に掲載され、脳動脈瘤研究領域における1施設からの報告としては世界有数である。また、我々が開発した脳動脈瘤モデルは国内のみならず国外においても利

用されており、脳動脈瘤誘発モデルとして極めて高い評価を受けている。また本研究中に、マウスにおいても脳動脈瘤の作成に成功しており(Stroke 33:1911-1915, 2002)、現在、遺伝子操作を施したマウスを用いることによる gene targeting 解析を進行中である。本研究では共同研究のもと、脳動脈瘤形成の分子機構と関連遺伝子の検索を精力的に解明していく。本研究から得られる成果により、従来の外科治療による治療法とは異なった予防医学からの観点に基づく新たな治療法の開発が見込まれる。

研究方法

平成13年度

—ヒト脳動脈瘤標本及びラットモデルを用いた組織学的検討と各種阻害剤による脳動脈瘤発生抑制効果の解析—

脳動脈瘤発生過程における主要組織変化である(1)内弾性板の消失、(2)中膜平滑筋層の浅薄化、(3)外膜の変性、の原因として、我々がすでに報告してきたアポトーシス反応、NO誘導血管リモデリング、MMPによる細胞外マトリックス分解などを中心に解析を行った。まず、ラット脳動脈瘤標本における immunohistochemistry、in situ hybridization による蛋白レベル、mRNA レベルでの発現確認と RT-PCR 法を行い mRNA の定量化を同時に施行した。ヒト標本採取についても関連因子の検索を行ったが、ヒト標本採取は橋本が行い、標本採取に関しては本学の倫理委員会から承認を得た。mRNA の定量化を正確に行うためにリアルタイム PCR 解析システムを購入した。

< NO 誘導血管リモデリング >

Shear stress の増大によって発現した iNOS が NO を誘導し血管リモデリングに大きく関与していることはすでに報告した(Circulation 2000;2532-38)。Shear stress は多数の転写因子を活性化することが明らかにされているが、本研究では iNOS を誘導する過程において何らかの転写因子が関与していると予想され、特に in vitro のデータから注目されている転写因子の活性化を検討し、shear stress との関連性について解析を行った。

< MMP による細胞外マトリックス分解 >

MMP family の中でも血管主要細胞外マトリックスであるエラスチンやコラーゲン IV を溶解する MMP-2、-9、マクロファージと深い関連をもつ MMP-12 を中心に局在発現、機能解析を immunohistochemistry、zymography などを用いて検討した。また MMP 制御因子である TIMP などの発現についても同時に解析した。

平成14年度

—knockout mice、transgenic mice による gene targeting 解析—

前年度において脳動脈瘤形成に関与する可能性が高いと判断した因子に関して、gene targeting mice を作成し、脳動脈瘤誘発処置を施し、脳動脈瘤形成状況を wild-type と比較検討した。また、組織学的には、光顕レベル、電顕レベルにて内皮細胞、内弾性板、平滑筋細胞層、外膜それぞれの形態、変性の程度の相違について検討し、対象因子の役割を解析した。特にマウスの脳血管は組織標本が極めて小さく、数個の細胞を対象とした。

—各種 chemokines—

前年度において検討された MMP の活性化、アポトーシス、NO 産生の誘導因子を検討した。特に活性化された内皮細胞、平滑筋細胞、また誘導されたリンパ球、マクロファージなどの炎症細胞における細胞内 messenger (Ras, MAPK) や生理活性物質 (ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, MCP-1, TNF α , IL-1, IL-3, IL-6) の発現解析を試みた。

平成 15 年度

—家族性脳動脈瘤家系における遺伝子解析—

脳動脈瘤についての遺伝子発現、遺伝子解析をヒト家族性脳動脈家系を用いて行った。血管病変および末梢血液の採取に際しては、当該患者のインフォームドコンセントが得られた場合のみとし、遺伝子解析については、当施設の倫理委員会において承認が得られており、その範囲においてのみ行った。

研究結果

1) 各種生理活性因子の検索

ラット自然誘発脳動脈瘤モデル（一側頸動脈結紮＋腎性高血圧＋食塩負荷）を用いて、脳動脈瘤形成過程における発現遺伝子、蛋白を解析した。この中で特に当該血管内皮における eNOS 発現の低下、当該血管平滑筋層における iNOS 発現の上昇と活性型 MMP-2, 9, 12 の上昇、endothelin receptorB 発現の上昇を観察した。また iNOS 抑制剤 (aminoguanidine) による脳動脈瘤の発生率の低下を確認した。

2) マウスにおける脳動脈瘤モデルの作成と解析

マウスにおいても一側頸動脈結紮＋腎性高血圧＋食塩負荷などにより、一定の確率で自然誘発脳動脈瘤を形成することに成功し、ラットモデルと同様に、光顕レベル、電顕レベルで組織学的にヒト脳動脈瘤と同様の所見を有していることを確認した。さらに iNOS knockout マウスではコントロールマウスと比べて脳動脈瘤の形成に抑制がかかることを見い出した。

3) 各種因子の解析

現在、ラットモデルを用い、脳動脈瘤形成過程における遺伝子発現の変化を血管リモデリング（アポトーシス関連因子、転写因子）、細胞外マトリックス分解（MMP 制御因子である TIMP、など）、平滑筋形質転換などの観点から解析を加え、脳動脈瘤の発生、増大、破裂の各々の段階における関与遺伝子・蛋白の探索を継続して行なっている。さらに各種遺伝子操作マウスにおける脳動脈瘤の形成を wild type と比べて比較検討する予定である。

4) ラットにおける関連遺伝子解析

ラット脳動脈瘤モデルを用いて、脳動脈瘤形成過程における関連遺伝子の発現を検討した。本モデルでは、高血圧負荷、一側頸動脈閉塞による hemodynamic stress の変化が脳動脈瘤形成に重要であり、vascular remodeling に関与する遺伝子（各種成長因子、ET、ACE、endoglin、eNOS、iNOS、MMP など）の発現パターンを経時的に解析した。組織採取には laser microdissection technique 法を用い、微量 mRNA 検出のために adaptor-tagged competitive PCR (Nucleic Acids Res25: 4694-4696, 1997) を用いた。その結果、脳動脈瘤に関連する遺伝子群の発現亢進が確認され、論文作成中である。

5) 家族性脳動脈瘤における関連遺伝子の検索

脳動脈瘤関連因子をさらに検索するために家族性脳動脈瘤家系を集積し、本家系において脳動脈瘤の形質発現に強く関与する遺伝子の同定を連鎖解析により genome-wide で行った。我々の収集しえた 20 家系、約 150 名で解析を進めたところ、Sib-pair で報告されている 7 番染色体の Elastin との連鎖はないことを報告した (Stroke 2003 34: 892-900)。また、連鎖解析の結果 12q11-13、17cen、19q13、Xp22 に連鎖領域を見出している。我々の連鎖領域である 19q13、Xp22 は、Finland からの報告と共通した領域である。本研究では、これらの連鎖領域に存在する遺伝子をさらに絞り込み、得られた関連遺伝子についてラットモデルを用いて発現を上記の方法を用いて組織学的に経時的に検討しているところである。

今後の展望

脳動脈瘤の発生機序として、1. shear stress の増大により SSRE (shear stress response element) などを介した内皮細胞、平滑筋細胞内シグナル伝達が活性化し、同時に内皮細胞では細胞接着分子が細胞表面に発現し、単球や血小板が内皮細胞へ接着したり、内皮細胞が障害され内皮下組織に付着して種々の生理活性物質を放出する。2. 単球やリンパ球は chemokines (MCP-1 等) などの影響を受け遊走し、一部はマクロファージ等に形質転換する。3. マクロファ

ージなどの炎症関連細胞が種々の cytokines (TNF α , IL-1, IL-3, IL-6 等)を放出する。4. shear stress および cytokines によって、細胞外マトリックスの分解を促す MMP や先述したアポトーシス、NO 産生の関連因子が発現し、血管リモデリングが誘導され、脳動脈瘤発生へと進展する、という仮説を立てている。本研究では、特に shear stress から脳動脈瘤形成に至る一連の分子機構を明らかにするために、1. ラット脳動脈瘤モデルにおける脳動脈瘤発生に関わる諸因子の遺伝子発現解析と蛋白レベルでの組織学的検討と各種阻害剤による脳動脈瘤発生抑制効果の解析、2. 新たに作製したマウスの脳動脈瘤モデルを用いたノックアウトマウス、トランスジェニックマウスによる gene targeting 解析、3. ヒト脳動脈瘤標本を用いた組織学的検討と培養した ex vivo assay 系を用いた各因子の相互関連分析、4. ヒト多発性脳動脈家系における関連遺伝子の検索 を同時進行させている。